



Інструкція з використання



Набір діагностичний «Biocore® SARS-CoV-2» для виявлення РНК коронавірусу SARS-CoV-2 методом ЗТ-ПЛІР у реальному часі (300 реакцій).

Для *in vitro* діагностики.

Призначення:

Набір діагностичний «Biocore® SARS-CoV-2» (у подальшому Набір) призначений для виявлення РНК коронавірусу SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, Коронавірус тяжкого гострого респіраторного синдрому-2), що викликає гостру респіраторну хворобу COVID-19 (Coronavirus disease 2019) у людини, методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛІР-РЧ, rRT-PCR).

Цільова група: пацієнти з симптомами ГРВІ, особи, які перебували в контакті з хворими на COVID-19, медичні працівники та інші особи, що перебувають у епідеміологічній зоні.

Застосування: Набір застосовується у клінічних діагностичних лабораторіях, а також в інших установах, які працюють в області *in vitro* діагностики.

Увага! Для використання Набору лабораторія має бути оснащеною відповідним обладнанням та витратними матеріалами для проведення ПЛІР у реальному часі і відповідати вимогам Державних санітарних норм і правил «Організація роботи лабораторії при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами».

Загальна інформація:

Набір «Biocore® SARS-CoV-2» має однопробірковий одностадійний формат, без окремого етапу синтезу кДНК на матриці вірусної РНК. Етап зворотної транскрипції (ЗТ) відбувається в реакційній суміші безпосередньо перед стартом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛІР). Проведення аналізу ґрунтується на *TaqMan*-технології методу ПЛІР-РЧ. Для запобігання виникнення хибно-позитивних результатів внаслідок перехресної контамінації, а також контролю виділення РНК і проходження ЗТ-ПЛІР-РЧ реакції, в Наборі використовуються урацил-ДНК-глікозилаза (УДГ, UDG) та внутрішній ендогенний контроль (БК - ген *RNase P* людини).

Аналітичні характеристики:

Валідацію Набору «Biocore® SARS-CoV-2» проводили шляхом використання контрольного матеріалу: EURM-019 ssRNA fragments of SARS-CoV-2 (JRC, EU), AcroMatrix™ COVID-19 RNA control (Thermo Fisher Scientific, USA), SARS-CoV-2 positive control: plasmid DNA (Synbio Technologies, USA).

Специфічність Набору оцінювали як здатність на 100% диференціювати РНК вірусу SARS-CoV-2 від РНК/ДНК інших інфекційних агентів вірусного та бактеріального походження. Встановлено відсутність хибно-позитивних та хибно-негативних результатів, а також неспецифічних реакцій зі сторонніми організмами.

Межа детектування (limit of detection, LOD) набору становить близько 10 копій на реакцію, аналітична чутливість складає 2×10^3 ГЕ/мл.

Склад:

Набір «Biocore® SARS-CoV-2» розрахований на 300 реакцій об'ємом 20 мкл. До складу набору входять такі компоненти:

ПЛІР-РЧ суміш (4x)	– 3 пробірки 0,5 мл
Суміш праймерів та зондів	– 3 пробірки 1 мл
НКЗ (негативний контрольний зразок)	– 1 пробірка 0,15 мл
ПКЗ (позитивний контрольний зразок)	– 1 пробірка 0,15 мл

Всі компоненти Набору, за виключенням **ПКЗ**, зберігаються при температурі від **мінус 18°C** до **мінус 24°C**. Після першого розморожування **ПКЗ** зберігається при температурі від **плюс 4°C** до **плюс 8°C**.

Етапи проведення аналізу:

1. Екстракція РНК з досліджуваного матеріалу

Біологічним матеріалом для екстракції РНК слугують зразки з верхніх дихальних шляхів (мазки із зіву, мазки з носа, носоглоткові секрети), зразки з нижніх дихальних шляхів (мокротиння, секрети дихальних шляхів, рідина бронхоальвеолярного лаважа), кров, сеча, фекалії та кон'юнктивальний секрет людини. Рекомендації щодо відбору, зберігання та транспортування зразків матеріалів для тестування на SARS-CoV-2 описані в Стандартах медичної допомоги «Коронавірусна хвороба (COVID-19)», затверджених Наказом МОЗ України від 28.03.2020 № 722.

Увага! При підготовці зразків для дослідження необхідно дотримуватись стандартних заходів безпеки з метою мінімізації можливості інфікування та забруднення навколишнього середовища, керуючись при цьому діючими Стандартами медичної допомоги «Коронавірусна хвороба (COVID-19)», Державними санітарними нормами і правилами, а також тимчасовими рекомендаціями ВООЗ «Лабораторні вказівки щодо біобезпеки, пов'язані з коронавірусною хворобою (COVID-19)» («Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19)», https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331500/WHO-WPE-GI_H-2020.2-en.g.pdf)

Екстракцію РНК з біологічного матеріалу проводять за допомогою будь-якого комерційного набору, призначеного для виділення РНК згідно інструкції виробника. Нижче наведено перелік рекомендованих наборів:

Тип зразку	Назва набору	Виробник та Кат. №
Мазки, секрети, мокротиння	MagMAX™ Viral RNA Isolation Kit GeneJET Viral DNA/RNA Purification Kit QIAamp Viral RNA Mini Kit TRIzol™ Plus RNA Purification Kit	Applied Biosystems™ AM1939 Thermo Scientific™ K0821 Qiagen, 52904/52906 Invitrogen™ 12183555
Кров, сеча	MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit	Applied Biosystems™ A27828
Фекалії	RNeasy Power Microbiome Kit	Qiagen, 26000-50

За необхідності вихід та чистоту екстрагованої РНК можна перевірити методом спектрофотометрії шляхом визначення співвідношення довжин хвиль $A_{260/280}$, яке має впадати у діапазон 1,8-2,0.

Для валідації Набору використовували комерційний набір TRIzol™ Plus RNA Purification Kit (Invitrogen™, Кат. № 12183555).

Увага! Допускається зберігання виділених зразків РНК протягом одного тижня при температурі -20°C та більш тривале зберігання при температурі $\leq -70^\circ\text{C}$.

2. Проведення процедури ЗТ-ПЛР-РЧ

Попередньо слід розморозити всі компоненти Набору, ретельно перемішати та осадити краплини короткочасним центрифугуванням.

Увага! Уникати потрапляння прямих сонячних променів на компоненти Набору. Розморозжені компоненти тримати при кімнатній температурі лише протягом часу, необхідного для приготування реакційної суміші.

Реакційну суміш готувати із розрахунку **5 мкл** ПЛР-РЧ суміші (4x) і **10 мкл** суміші праймерів та зондів на один зразок. Суміш ретельно перемішати на вортексі, краплини осадити короткочасним центрифугуванням. Використовуючи одноразові наконечники з аерозольним бар'єром, у відібрані ПЛР пробірки (стриповані пробірки, лунки планшету), враховуючи пробірки під НКЗ і ПКЗ, рознести по **15 мкл** реакційної суміші. Після цього внести по **5 мкл** РНК досліджуваних зразків, а в пробірки контролю ПЛР по **5 мкл** контрольних зразків.

Увага! Згідно вимог до методу ПЛР у реальному часі рекомендовано кожен досліджуваний зразок аналізувати у двох повтореннях з етапу екстракції НК.

Набір було валідовано для роботи з лінійкою приладів - ABI Prism 7500 (Applied Biosystems), QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems), Rotor-Gene Q (Qiagen), CFX96™ (Bio-Rad).

Прилад для проведення ПЛР-РЧ програмується згідно з інструкцією виробника, під час програмування враховуються наступні параметри:

- об'єм реакційної суміші **20 мкл**;
- функція пасивного референтного барвника ROX™ для приладів лінійки Applied Biosystems відключена;
- детектори флуоресценції обрані згідно таблиці 1;

Таблиця 1

Назва мішені	Канали флуоресценції
ген <i>ORF1ab</i> SARS-CoV-2	FAM / Green
ген <i>N</i> SARS-CoV-2	VIC / Yellow
БК (внутрішній контроль)	JUN / ROX / Orange

- температурний профіль режиму ампліфікації згідно таблиці 2;

Таблиця 2

Етапи	Збір даних	Цикли	Т	Час
1	-	1	25°C	2 хв
2	-	1	53°C	10 хв
3	-	1	95°C	2 хв
4	-	40	95°C	5 сек
5	✓*		60°C	30 сек

*Рівень флуоресценції за всіма каналами вимірюється на етапі 5.

3. Облік та інтерпретація результатів аналізу

Облік результатів ЗТ-ПЛР-РЧ аналізу проводиться за наявності або відсутності графіків ампліфікації та значень порогового циклу (Ct), що їм відповідає. За каналом FAM/Green реєструються дані, що відповідають гену *ORF1ab*, за каналом VIC/Yellow – гену *N* SARS-CoV-2, а за каналом JUN/ROX/Orange – БК.

Обробка отриманих даних здійснюється згідно інструкції до приладу. Прилад автоматично розраховує порогову (*threshold line*) та базову (*baseline*) лінії. За необхідності їх можна виставити у ручному режимі, окремо для кожного каналу. Порогова лінія встановлюється над рівнем «фонові флуоресценції», приблизно посередині логарифмічної фази графіків ампліфікації. Кінець базової лінії задається за 5 циклів до перетину графіком ампліфікації порогової лінії, а початок – за 12 циклів від кінця базової лінії.

Результати аналізу вважаються достовірними, якщо контрольні зразки відповідають критеріям, наведеним у таблиці 3:

Таблиця 3

Зразки	SARS-CoV-2		БК Jun/Orange
	ORF1ab Fam/Green	N Vic/Yellow	
НКЗ	Ct ≥ 37	Ct ≥ 37	Ct ≥ 37
ПКЗ	Ct < 35	Ct < 35	Ct < 35

Якщо значення негативного та позитивного контрольних зразків не відповідають зазначеним вимогам, то аналіз вважається некоректним і потребує повторного проведення.

Інтерпретація результатів ЗТ-ПЛР-РЧ аналізу щодо виявлення РНК коронавірусу SARS-CoV-2 проводиться згідно таблиці 4:

Таблиця 4

SARS-CoV-2 мішень*		БК Jun/Orange	Результат
ORF1ab Fam/Green	N Vic/Yellow		
Ct < 37		Ct < 35	Вірус виявлено
Ct ≥ 37		Ct < 35	Вірус відсутній
Ct ≥ 37		Ct ≥ 35	Сумнівний результат

*https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/8/20-1246_article

Зразок вважається позитивним на SARS-CoV-2 при наявності позитивного сигналу за будь-яким з генів (ORF1ab, N). У випадку виникнення сумнівного результату необхідно провести аналіз повторно, починаючи з етапу екстракції РНК.

4. Додаткова інформація

Виробник гарантує придатність Набору протягом **6 місяців** з дати виготовлення при дотриманні умов зберігання, транспортування та використання. Умови зберігання: компоненти набору зберігаються при температурі від **мінус 24°C** до **мінус 18°C**, за виключенням **ПКЗ**, який зберігається при температурі від **плюс 4°C** до **плюс 8°C** після першого розморожування. Під час транспортування Набору дозволяється одноразове короткочасне зберігання (протягом 1-2 діб) при температурі від **плюс 2°C** до **плюс 4°C**.

Відгуки, пропозиції та рекламції щодо якості Набору направляти:

Юридична адреса: вул. Петра Болбочана, 4-А, м. Київ, Україна, 01133;

Адреса виробництва: Харківське шосе, 48, м. Київ, Україна, 02160; тел.: +38 (044) 490-47-00,

e-mail: info@biocor-tech.com, www.biocor-tech.com

Графічний символ	Значення
	Ознайомитися із супровідними документами
	Температурне обмеження
	Ознайомитися з інструкцією по застосуванню
	Знак відповідності технічним регламентам
	Для діагностики in vitro
	Код партії
	Термін придатності
	Дата виробництва